

氏 名	石 毛 太 一 郎
学位（専攻分野の名称）	博 士（畜産学）
学 位 記 番 号	乙 第 925 号
学位授与の日付	平成 29 年 7 月 20 日
学 位 論 文 題 目	<b>ニホンウズラの host defense peptide 遺伝子の同定と多様性解析</b>
論 文 審 査 委 員	主査 教 授・農 学 博 士 半 澤 恵 教 授・農 学 博 士 野 村 こ う 教 授・農 学 博 士 河 野 友 宏 准 教 授・博 士（畜産学） 平 野 貴 博 士（畜産学） 椎 名 隆*

## 論 文 内 容 の 要 旨

自然免疫の主要な液性因子の 1 つが、宿主防御ペプチド（Host defense peptide, 以下 HDP と略）である。HDP は分子量 5~100 kDa のカチオンペプチドであり、多細胞生物が有害微生物を排除するペプチドとして多細胞生物の進化と共に高度に進化した。特に脊椎動物の HDP は獲得免疫との共進化をとげ複雑で大きな分子ファミリーを形成し、またその機能も微生物の細胞膜を破壊する抗菌活性に加えて、抗エンドトキシン活性、炎症制御、ならびに獲得免疫の惹起など免疫応答の極めて多様な側面に関与することが指摘されている。

鳥類において Granulysin/NK-lysin（以下 NKL と略）、Liver expressed antimicrobial peptide2（以下 LEAP-2 と略）、Cathelicidin（以下 CATH と略）および Avian  $\beta$ -defensin（以下 AvBD と略）の 4 群は、それらの機能や含有量から主要な HDP と考えられる。ニワトリ（*Gallus gallus*, *Gg*）ではこのうち NKL のアミノ酸置換および AvBD の遺伝子座数多型が病原微生物に対する抵抗性に関与することが指摘され、HDP を活用した抗病性の向上が検討されている。

ニホンウズラ（*Coturnix japonica*, *Cj*）は、本邦で家畜化された唯一の家禽であると共に、ニワトリのパイロットバードとして小格、早熟で、産卵能力も高い。また、品種が確立しておらず、近交系の作出が困難であるなどニワトリに比べて改良度が低く、またニワトリに比べ重篤な感染症に対しても不顕性感染を示すことがあることより、これら遺伝子における検索に適していると考えられる。

そこで本研究では、ニホンウズラを対象に前述の 4 群の主要 HDP 遺伝子領域を同定し、その遺伝子構造を決定し、mRNA 発現を確認すると共に、抗病性（抗菌活性）に関与する遺伝的多様性を明確にすることを目的とした。各 HDP 遺伝子領域の同定と塩基配列の決定にはキャピラリーシーケンサーと共に次世代シーケンサー（NGS）を使用した。また mRNA 発現の確認には RT-PCR 法を用いた。さらに DNA 多型解析には、来歴の異なる 6

\*東海大学 准教授

系統 (A, B, ND, K, Y, P) 99 個体のニホンウズラを供試した。

## 1. NKL

### 1) 遺伝子領域

ニワトリ *NKL* (*GgNKL*) との syntenic 領域 (13,679bp) にニホンウズラ *NKL* (*CjNKL*) 遺伝子 (1,311bp) を同定した。*CjNKL* は *GgNKL* と同様に 4 つのエキソンで構成され、open reading frame (ORF) の塩基配列および推定アミノ酸配列は *GgNKL* と 81.1% および 72.1% の類似性を示した。*CjNKL* の mature peptide の推定アミノ酸配列 (117aa) には *GgNKL* に比べて 2aa あるいは 1aa の欠損があったが、*NKL* に特徴的な saposin like type-B domain および Proline を保持していた。また、免疫系：脾臓、胸腺、ファブリキウス嚢および骨髄、消化器系：舌、食道&胃、十二指腸、膵臓、空腸、回腸、盲腸、結腸および肝臓を含む 16 臓器において *CjNKL* の mRNA の発現を確認した。以上のことから、*CjNKL* は、*NKL* の機能的な orthologous であることが示唆された。

### 2) 成熟型ペプチドの多型解析

*CjNKL* の mature peptide の 31 番目 (抗菌活性領域) のアミノ酸にグリシン (G) からアスパラギン酸 (D) への置換 (G31D, 以下 31G および 31D と略) を検出した。31D は調査した 6 系統 99 個体のうち B および ND 系を除く、A, K, P および Y 系に 0.05, 0.03, 0.69 および 0.05 の頻度で認められた。31G および 31D を含む抗菌活性領域のペプチド (30aa) を合成し、大腸菌に対する抗菌活性試験により、31G は 31D より抗菌活性が高いことを明らかにし、この差は net charge に起因することを示唆した。

## 2. LEAP-2

### 1) 遺伝子領域

ニワトリ *LEAP-2* (*GgLEAP-2*) との syntenic 領域 (27,626bp) にニホンウズラ *LEAP-2* (*CjLEAP-2*) 遺伝子 (1,749bp) を同定した。*CjLEAP-2* は *GgLEAP-2* と同様に 3 つのエキソンにより構成され、ORF の塩基配列および推定アミノ酸配列は *GgLEAP-2* と 92.6% および 90.8% の類似性を示した。*CjLEAP-2* の mature peptide の推定アミノ酸配列 (40aa) は *GgLEAP-2* と一致し、*LEAP-2* に特徴的な liver-expressed antimicrobial peptide 2 precursor を保持していた。また、消化器系：十二指腸、空腸、回腸、肝臓および腎臓を含む 5 臓器において *CjLEAP-2* の mRNA の発現を確認した。以上のことから、*CjLEAP-2* は *LEAP-2* の機能的な orthologous であることが示唆された。

## 2) 成熟型ペプチドの多型解析

*CjLEAP-2* の mature peptide を coding する塩基配列 (120bp) に DNA 多型は認められなかった。したがって LEAP-2 の抗菌作用は特定の抗原の認識に特化しているか、あるいは何等かの固有な機能を有するため、負の選択圧が働き多型が検出されなかったとも考えられる。

## 3. CATH

### 1) 遺伝子領域

ニワトリ *CATH* (*GgCATH*) 遺伝子群との synteny 領域 (12,460bp) に同じ順序・方向でタンデムに座位する 4 種類のニホンウズラ *CjCATH* 遺伝子: *CjCATH3* (809bp), *CjCAH2* (1058bp), *CjCATHB1* (1137bp) および *CjCATH1* (800bp) を同定した。これら 4 種の *CjCATHs* は、ニワトリ *GgCATHs* と同様にいずれも 4 つのエキソンにより構成され、ORF の塩基配列および推定アミノ酸配列は相同な *GgCATHs* と 76.1~95.2% および 62.3~94.7% の類似性を示した。*CjCATH3* (29aa), *CjCAH2* (32aa), *CjCATHB1* (40aa) および *CjCATH1* (26aa) の mature peptides の推定アミノ酸配列のアミノ酸残基の数は各々 orthologous である *GgCATHs* と一致し、各々 71.9~100% の類似性を示すと共に、いずれも CATH に特徴的な cathelicin domain を保持していた。さらに各 *CjCATHs* はアミノ酸配列の系統樹解析において、他鳥類の各 CATHs と共に、CATH1/3, CATH2 および CATHB1 の 3 つの clade を形成した。また、いずれの *CjCATHs* も骨髄において mRNA の発現が確認され、*CjCATH2* を除く 3 種の *CjCATHs* の mRNA はファブリキウス嚢を含む複数の臓器で検出された。以上のことから、これら *CjCATHs* は CATHs の機能的な orthologous であることが示唆された。

### 2) 成熟型ペプチドの多型解析

*CjCATH3*, *CjCATH2*, *CjCATHB1* および *CjCATH1* の mature peptide の塩基配列にそれぞれ 0, 10, 2 および 1 個の SNPs が検出された。これらのうち、*CjCATH2* では 6 個が、*CjCATHB1* では 1 個がアミノ酸置換を伴い、特に *CjCATH2* の *CjCATH2\*02* allele 由来の I145F および Q148H は、ND 系を除くすべての系統で確認され、抗菌活性に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、*CjCATHB1* の *CjCATHB1\*04* allele 由来の P245H は、K 系のみで確認され、抗菌活性に影響を及ぼす可能性が示唆された。したがって、*CjCATH2* および *B1* の allele (*CjCATH* の haplotype) 間で抗菌活性が異なる可能性が示唆された。Intron を含めた SNPs に基づき *CjCATH3*, *CjCATH2*, *CjCATHB1* および *CjCATH1* に 6, 4, 4 および 6 種類の allele が、さらにこれら allele の組合せによる 9 種類の haplotype が確認された。K 系では 4 種すべて、B 系では *CjCATHB1* を除く 3 種の *CjCATH* に系統特異的

な allele が検出され、それらの組合せおよびこれに加えて ND 系に系統特異的な haplotype が認められた。

#### 4. AvBD

##### 1) 遺伝子領域

ニワトリ AvBD (*GgAvBD*) 遺伝子群との synteny 領域 (56,812~70,343bp) に概ね同じ順序・方向でタンデムに座位する 12~16 個のニホンウズラ *CjAvBD* 遺伝子: *CjAvBD13* (3,141~4,545+4n (GGAA の繰り返し配列)), *CjAvBD12* (892~895bp), *CjAvBD11* (2,315~2,322bp), *CjAvBD10* (2,034~2,041bp), *CjAvBD9* (2,381~2,426bp), *CjAvBD8* (2,273~2,279bp), *CjAvBD101\*1~5* (1,554~1,803bp), *CjAvBD2* (1,726~1,757bp), *CjAvBD1* (1,784~1,801bp), *CjAvBD5* (1,406~1,423bp), *CjAvBD4* (1,401~1,412bp) および *CjAvBD14* (540~552bp) を同定した。*CjAvBD* 領域には、ニワトリ *GgAvBD3* および *GgAvBD7* の orthologous は認められず、また *GgAvBD6* に相同な *CjAvBD101* は 1~5 個の遺伝子座数多型を示した。*CjAvBD4* を除く *CjAvBDs* は、各々相同な *GgAvBDs* と同じ exon-intron 構造を有し、ORF の塩基配列および推定アミノ酸配列は相同な *GgAvBDs* と 78.0~97.1% および 66.0~95.5% の類似性を示した。*CjAvBD13* (65aa), *CjAvBD12* (45aa), *CjAvBD11* (80aa), *CjAvBD10* (41aa), *CjAvBD9* (42aa), *CjAvBD8* (41aa), *CjAvBD101*  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\theta$  (41aa), *CjAvBD2* (39aa), *CjAvBD1* (40aa), *CjAvBD5* (41aa), *CjAvBD4* (38aa) および *CjAvBD14* (44aa) の mature peptides の推定アミノ酸配列において、*CjAvBD101*  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\theta$  は 1aa 短く、*CjAvBD14* は 5aa 長かったのを除き、他の *CjAvBDs* のアミノ酸残基の数は各々 orthologous である *GgAvBDs* と一致し、58.5~92.9% の類似性を示した。またいずれの *CjAvBDs* の推定アミノ酸配列も、AvBD に特徴的な  $\beta$ -defensin motif を保持していた。さらに *CjAvBD* は mature peptide のアミノ酸配列の系統樹解析において、他鳥類の AvBDs と共に orthologous である遺伝子毎に clade を形成した。*CjAvBD8* の mRNA は肝臓でのみ確認され *CjAvBD4* の mRNA は肝臓と骨髄でのみ確認された。また、*CjAvBD9* の mRNA は一部消化系臓器など上皮系組織を含む臓器の一部で mRNA 発現が確認された。*CjAvBD1*, *CjAvBD5* および *CjAvBD10* の mRNA は、免疫系、消化器系および呼吸系など、上皮系組織を含む多くの臓器で確認された。以上のことより、これら *CjAvBDs* は AvBDs の機能的な orthologous であること、ならびにその遺伝子構成には種特異性があることが示唆された。

##### 2) 成熟型ペプチドの多型解析

*CjAvBD1* および *CjAvBD12* の PCR 産物の塩基配列に 18 個および 13 個の SNPs が検出された。これら SNPs に基づき *CjAvBD1* および *CjAvBD12* に 9 および 8 種類の allele が、

さらにこれら allele の組合せによる 10 種類の haplotype が確認された。A 系および K 系では *CjAvBD1* および *CjAvBD12* 共にそれぞれ系統特異的な allele が検出され、それらの組合せを含む 3 種類の系統特異的な haplotype が認められた。

これらのうち、*CjAvBD1* と 12 のホモ接合個体を確認した 7 種類の haplotype の *CjAvBD* 領域 (56,812~70,343bp) の塩基配列を精査したところ、それらの遺伝子構成は *CjAvBD101* を除き同一であった。また、すべての *CjAvBDs* の ORF に haplotype 間 SNPs が確認された。特に *CjAvBD4*, *CjAvBD13* および *CjAvBD14* の mature peptide に net charge を変化させるアミノ酸置換を確認した。一方、*CjAvBD101* は塩基配列の相同性と系統樹解析に基づき  $\alpha$ ,  $\beta$  および  $\theta$  の 3 種類に大別され、各 haplotype における遺伝子座数は 0~1, 0~2 および 0~3, 計 1~5 個であり、また allele 間で mature peptide に net charge を変化させるアミノ酸置換が確認された。

## 5. 結論

1) ニホンウズラの主要 4 種 HDP の遺伝子構成およびそれらの mRNA 発現は基本的にはニワトリの orthologous と相同であることが示唆された。しかし、*CjAvBD* 領域の遺伝子構成には *CjAvBD3* および *CjAvBD7* の欠損および *GgAvBD6* の orthologous : *CjAvBD101* 重複変異が認められ、このことがニホンウズラ特異的な微生物制御をもたらす可能性がある。

2) 6 系統 99 個体は、*CjNKL* の 2 種類の alleles, *CjCATHs* の 9 種類の haplotypes および *CjAvBD* の 10 種類の haplotypes の組合せによる多型カタログに基づき、67 種類に分類された。これらの組合せの中には複数の HDP, すなわち *CjNKL*, *CjCATH2*, *CjAvBD4*, *CjAvBD13* および *CjAvBD14* の抗菌活性領域の net charge の変化を伴う非同義置換、ならびに *CjAvBD101*  $\alpha$ ,  $\beta$  および  $\theta$  の遺伝子座数多型を含み、これらの変異が多様かつ進化速度の速い微生物に対する種としての柔軟な対応に繋がる正の選択圧の結果とも考えられる。また、これらの多様性は抗菌活性の多寡に基づく病原微生物に起因する疾患感受性、ならびに消化管内をはじめ生体各所に形成される細菌叢の構成に影響する可能性がある。また HDP は抗菌活性のみならず、免疫調節因子としての機能も知られている。したがって、*LEAP-2* にのみ DNA 多型が認められなかったことは、その機能的特異性に起因するとも考えられる。

以上要するに本研究は、ニホンウズラの主要 4 種 HDP 遺伝子とその多様性に関する基礎的知見を明確にすることを示した。したがって本研究の成果は、今後のニホンウズラ HDP 遺伝子の解析を一段と進展させるのみならず、家禽の抗病性育種に大いに貢献するものと考えられる。

## 審査報告概要

本研究はニホンウズラ自然免疫の液性因子である宿主防御ペプチド (Host defense peptide:HDP) のうち, 主要な 4 群, すなわち NK-lysin (NKL), Liver expressed antimicrobial peptide2 (LEAP2), Cathelicidin (CATH) および Avian  $\beta$ -defensin (AvBD) を対象に, それらの遺伝子構成および遺伝的多様性を調査したものである。ウズラのこれら 4 群の HDPs の遺伝子構成および mRNA 発現は基本的にはニワトリの直系遺伝子と同等であることを明確にした。また多様性解析により, 一部の遺伝子群 (LEAP2, ならびに一部の CATHs および AvBDs) は極めて高度に保存され, 一定 (かつ必須) の生物活性が維持されている一方, 他の遺伝子群 (NKL, ならびに一部の CATHs および AvBDs) は, 微生物の多様な進化に対応しうるアミノ酸置換や遺伝子座数多型など生物活性に影響する遺伝的多様性を示すことを明確にし, その一端として NKL のアミノ酸置換が大腸菌に対する抗菌活性に影響することを確認した。これら 4HDPs の同定と生物活性に影響しうる多様性を整理した本研究の成果は, これら HDPs の遺伝的多様性が抗微生物活性や腸内細菌叢への影響を明確にすることにより, 抗病性育種の重要な指標になりうるものと評価される。よって, 審査員一同は博士 (畜産学) の学位を授与する価値があると判断した。